

松村 謙一郎 (長崎県) 昭和35年9月14日生

授与年月日 平成3年3月31日

主論文 *Schistosoma mansoni* : Possible Involvement of Protein Kinase C in Linoleic acid-induced Proteolytic Enzyme Release from Cercariae

(リノール酸によって誘発されるマンソン住血吸虫セルカリアの蛋白分解酵素分泌反応へのプロテインキナーゼCの関与)

論文内容の要旨

緒言

住血吸虫セルカリアの皮膚侵入機序を明らかにすることは、住血吸虫症の感染予防に有効な忌避剤の開発につながることから、近年注目をあびている研究課題の一つである。セルカリアは皮膚不飽和脂肪酸、とりわけリノール酸と接触すると特有な運動を開始するとともに、蛋白分解酵素を分泌し皮膚に侵入する。この蛋白分解酵素の性状に関しては多くの研究がなされ、基質特異性の広いセリンプロテアーゼであることが明らかになっているが、不飽和脂肪酸がどのような機序で侵入運動と蛋白分解酵素分泌を誘発させるのかは全く不明である。

著者はリノール酸で誘発される侵入運動・蛋白分解酵素分泌反応は、近年話題の細胞内情報伝達機構であるイノシトールリン脂質代謝にともなう protein kinase C (PKC) の活性化と細胞内 Ca^{2+} の上昇によって起ると考え、ホルボールエステル (PKC 活性化剤) と Ca^{2+} イオノフォア (細胞内 Ca^{2+} 上昇剤) がセルカリアに侵入運動を誘発させるか、およびリノール酸 (自然界に於ける侵入運動誘発剤) によって誘発される侵入反応が PKC 阻害剤と Ca 代謝阻害剤によって抑制されるかを観察した。

実験材料と方法

Biomphalaria glabrata (Newton's NIH Puerto Rican/Brazilian M-line) に *Schistosoma mansoni* (NIH-Sm-PR-1) を感染させ、8—12週後に感染員よりセルカリアを脱塩素水道水中に遊出させた。脱塩素水中のカルシウム濃度は $0.37 \pm 0.06 \text{ mM}$ (原子吸光計にて測定) であった。ミリポアフィルター ($8 \mu\text{m}$ poresize) で $2,000\text{--}4,000$ 隻/ml に濃縮されたセルカリアを薬物に曝し、実体顕微鏡下にセルカリアの運動の変化を観察した後、セルカリア飼育液に分泌された蛋白分解酵素の活性を Azocoll を基質として測定した。使用した薬物は、リノール酸 (生理的刺激剤, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となる様飼育シャーレ底面に塗布した)、ホルボールエステル (TPA, PDBu), Ca ionophore (A23817), カルシウム代謝阻害剤 (verapamil, TMB-8), カルモ

ジュリン阻害剤 (W-7, trifluoperazine), PKC 阻害剤 (H-7), EGTA である。

実験成績と考案

セルカリアは Ca^{2+} 存在下にホルボールエステル (TPA, $0.02\text{--}2 \mu\text{M}$, PDBu $0.2\text{--}2 \mu\text{M}$) に曝されると、リノール酸に曝されたのと同様に、水中 (カルシウム 0.37 mM を含んでいる) での遊泳を止め、特有な侵入運動 (セルカリア前端部の伸縮運動など) を開始し、蛋白分解酵素を分泌した。このホルボールエステルによる酵素分泌は dose-dependent であった。しかしセルカリア飼育液中の Ca^{2+} を除去 (終濃度 5 mM となるよう EGTA 添加) するとホルボールエステルによる蛋白分解酵素分泌は誘発されなかった。

PKC の特異的阻害剤 H-7 ($100 \mu\text{M}$) はホルボールエステル ($2 \mu\text{M}$) によるセルカリアの侵入運動・蛋白分解酵素分泌を完全に抑制した。またリノール酸による酵素分泌も H-7 ($100 \mu\text{M}$) により完全ではないが抑制された (ただし H-7 はリノール酸による侵入運動は抑制できない)。これらの結果はセルカリアの侵入運動・蛋白分解酵素分泌に PKC が関与していることを示している。

Ca ionophore は高濃度 ($10\text{--}100 \mu\text{M}$) では、飼育液中の Ca^{2+} の存在にかかわらず、セルカリアに侵入運動と蛋白分解酵素分泌を誘発させた。しかし通常用いられる量 ($0.5\text{--}1 \mu\text{M}$) の Ca ionophore には全く反応しなかった。リノール酸による侵入運動・蛋白分解酵素分泌は飼育液中の Ca^{2+} の除去 (終濃度 5 mM となるよう EGTA 添加) により部分的に抑制された。しかしカルモジュリン阻害剤 (W-7, $1\text{--}100 \mu\text{M}$; trifluoperazine, $0.5\text{--}50 \mu\text{M}$), カルシウム代謝阻害剤 (verapamil, $1\text{--}100 \mu\text{M}$; TMB-8, $0.2\text{--}20 \mu\text{M}$) はリノール酸による侵入運動・蛋白分解酵素分泌を抑制しなかった。

以上の結果は、いくつか疑問は残るがセルカリアの蛋白分解酵素分泌に Ca^{2+} も関与している可能性を強く示唆している。

これまでの先人の観察から、セルカリアよりの蛋白分解酵素分泌は分泌腺 (pre-acetabular gland) を取り囲む筋肉の収縮によって起ると考えられている。PKC と Ca^{2+} は筋収縮に重要な役割を担っている。我々の実験結果は先人の分泌機序説を支持するものであろう。近年住血吸虫の PKC は Ca^{2+} independent であること、またラット脳下垂体等に存在する PKC が同じく Ca^{2+} independent で不飽和脂肪酸によって活性化されることが報告されている。興味あることに上記 PKC を活性化するとされている不飽和脂肪酸群はセルカリアに侵入運動を引き起こし、PKC を活性化しない脂肪酸群はセルカリアの侵入運動も誘発しないことが文献

調査よりわかった。このようなことから、セルカリアが終宿主の皮膚リノール酸に接触すると、リノール酸がセルカリア外皮よりセルカリア細胞内に浸透しセルカリアの PKC が活性化され侵入運動・蛋白分解酵素分泌がおこることが考えられる。

論文審査の結果の要旨

松村謙一郎は昭和60年3月長崎大学医学部を卒業、同年5月医師国家試験に合格し、同年6月より国立長崎中央病院で2年間の研修を行い、昭和62年4月長崎大学大学院医学研究科に入学した。大学院においては病理系を修め、蠕虫学を主科目として所定の単位を修得した。この間熱帯医学研究所寄生虫学部門青木克己教授の指導のもと、主論文の「Schistosoma mansoni: Possible involvement of protein kinase C in linoleic acid-induced proteolytic enzymerelease from cercariae」を完成し、他参考論文2編を添えて、長崎大学大学院研究科委員会に提出した。

長崎大学大学院研究科委員会は、これを平成3年1月23日の定例委員会に付議し、論文の内容を検討し、研究歴を審査した結果、受理して差し支えないものと認めたので、上記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心として慎重に審査し、平成3年3月6日の定例委員会でその結果を報告した。

本論文は住血吸虫セルカリアの皮膚への侵入運動に protein kinase C (PKC) が関与することを明らかにしたものである。自然界においてはセルカリアは皮膚不飽和脂肪酸、とりわけリノール酸と接触すると水中での遊泳運動を停止し、特有な侵入運動を開始するとともに蛋白分解酵素を分泌する。

著者はリノール酸で誘発されるセルカリアの侵入運動、蛋白分解酵素分泌が PKC の活性化と細胞内 Ca^{2+} の上昇によって起こると考え、ホルボールエステル (PKC 活性化剤) と Ca^{2+} イオノフォア (細胞内 Ca^{2+} 上昇剤) がセルカリアに侵入運動を誘発させ、蛋白分解酵素を分泌させるか、及びリノール酸によって誘発される侵入運動、蛋白分解酵素分泌が PKC 阻害剤と Ca^{2+} 代謝阻害剤によって抑制されるかを観察した。その結果下記することが明らかとなった。

PKC の関与について：

1) セルカリアは Ca^{2+} 存在下にホルボールエステル (TPA, 0.02—2 μM ; PDBu, 0.2—2 μM) に曝されると、リノール酸に曝されたと同様特有な侵入運動を開始し、蛋白分解酵素を分泌すること、2) ホルボールエステルによる酵素分泌は dose-dependent であること、3) このホルボールエステルの効果は H-7 (PKC の特異的阻害剤) で完全に抑制されること、4) リノール酸による酵素分泌も H-7 によって完全ではないが抑制される。

Ca^{2+} の関与について：

1) Ca イオノフォアは侵入運動を誘発するが、高濃度が必要、2) セルカリア飼育液より Ca^{2+} を除去するとリノール酸による酵素分泌は低下する、3) カルモジュリン阻害剤 (W-7, trifluoperazine)、カルシウム代謝阻害剤 (Verapamil, TMB-8) はリノール酸による侵入運動、酵素分泌を抑制しない。

以上の結果はセルカリアの侵入運動、蛋白分解酵素分泌には PKC が関与すること、 Ca^{2+} の関与も考慮すべきことを示唆している。

更に著者はこれらのデータと文献的考察から、セルカリアが終宿主の皮膚リノール酸に接触すると、リノール酸がセルカリア外皮よりセルカリア細胞内に浸透しセルカリアの PKC が活性化され侵入運動が始まるとのユニークな侵入機序の説を提案した。

研究科委員会は審査委員の報告に基づき、これを討論に付して審議した結果、本論文は住血吸虫セルカリアの皮膚侵入機序の研究を大いに進展させるものであり、医学の進歩に貢献するところ大であって、学位に値するものと認め、合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	神原 廣二
	副査	教授	谷山 紘太郎
	副査	教授	小池 正彦